









ARTIGO ORIGINAL

Clinical and molecular profile of newborns with confirmed or suspicious congenital adrenal hyperplasia detected after a public screening program implementation ☆,☆☆



Cristiane Kopacek ^{a,b,c,*}, Mayara J. Prado ^{d,e}, Claudia M.D. da Silva ^d,
Simone M. de Castro ^{a,f}, Luciana A. Beltrão ^{a,c}, Paula R. Vargas^a, Tarciana Grandi^d,
Maria L.R. Rossetti^{d,e} e Poli Mara Spritzer ^{b,g}

^a Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Unidade de Triagem Neonatal, Laboratório de Triagem Neonatal, Porto Alegre, RS, Brasil

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-graduação em Endocrinologia, Porto Alegre, RS, Brasil

^c Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil

^d Secretaria Estadual da Saúde, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Porto Alegre, RS, Brasil

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, RS, Brasil

^f Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Escola de Farmácia, Departamento de Análises, Porto Alegre, RS, Brasil

^g Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Divisão de Endocrinologia, Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Porto Alegre, RS, Brasil

Recebido em 30 de abril de 2017; aceito em 12 de março de 2018

KEYWORDS

Congenital adrenal hyperplasia;
Newborn screening;
Clinical profile;
Molecular diagnosis;
Genotype-phenotype

Abstract

Objective: To describe the results obtained in a neonatal screening program after its implementation and to assess the clinical and molecular profiles of confirmed and suspicious congenital adrenal hyperplasia cases.

Methods: A cross-sectional study was conducted. Newborns with suspected disease due to high 17-hydroxyprogesterone levels and adjusted for birth weight were selected. Classical congenital adrenal hyperplasia (salt-wasting and simple virilizing forms) was diagnosed by an increase in 17-hydroxyprogesterone levels as confirmed in the retest, clinical evaluation, and genotype determined by SNaPshot and multiplex ligation-dependent probe amplification.

DOI se refere ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2018.03.003>

☆ Como citar este artigo: Kopacek C, Prado MJ, da Silva CM, de Castro SM, Beltrão LA, Vargas PR, et al. Clinical and molecular profile of newborns with confirmed or suspicious congenital adrenal hyperplasia detected after a public screening program implementation. J Pediatr (Rio J). 2019;95:282–90.

☆☆ Estudo feito no Serviço de Referência em Triagem Neonatal (centro de referência para triagem neonatal do Sistema Público de Saúde) do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas e no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: criskopacek@gmail.com (C. Kopacek).

Results: After 24 months, 15 classic congenital adrenal hyperplasia cases were diagnosed in a total of 217,965 newborns, with an estimated incidence of 1:14,531. From 132 patients, seven non-classical and 14 heterozygous patients were screened for *CYP21A2* mutations, and 96 patients presented false positives with wild type *CYP21A2*. On retest, increased 17-hydroxyprogesterone levels were found in classical congenital adrenal hyperplasia patients and showed significant correlation with genotype-related classical genital adrenal hyperplasia. The most frequent mutations were IVS2-13A/C>G followed by gene deletion or rearrangement events in the classical form. In non-classical and heterozygous diseases, p.Val282Leu was the most common mutation.

Conclusions: The results underscore the effectiveness of congenital adrenal hyperplasia neonatal screening in the public health system and indicate that the adopted strategy was appropriate. The second sample collection along with genotyping of suspected cases helped to properly diagnose both severe and milder cases and delineate them from false positive patients.

© 2018 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Pediatria. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PALAVRAS-CHAVE

Hiperplasia adrenal congênita;
Triagem neonatal;
Perfil clínico;
Diagnóstico molecular;
Genótipo-fenótipo

Perfil clínico e molecular de recém-nascidos com suspeita ou confirmação de hiperplasia adrenal congênita após a implementação de um programa público de triagem neonatal

Resumo

Objetivo: Descrever os resultados obtidos em um programa de triagem neonatal após sua implementação e avaliar os perfis clínicos e moleculares de casos confirmados e suspeitos de hiperplasia adrenal congênita.

Métodos: Foi feito um estudo transversal. Recém-nascidos com suspeita da doença devido aos altos níveis de 17-alfa-hidroxiprogesterona e ajustados pelo peso ao nascer foram selecionados. A hiperplasia adrenal congênita clássica (forma perdedora de sal e forma virilizante simples) foi diagnosticada por um aumento nos níveis de 17-alfa-hidroxiprogesterona confirmado no reteste, avaliação clínica e genótipo determinado com o uso do ensaio *SNaPshot* e amplificação multiplex de sondas dependente de ligação.

Resultados: Após 24 meses, 15 casos clássicos de hiperplasia adrenal congênita foram diagnosticados em 217.965 recém-nascidos, com uma incidência estimada de 1:14.531. De 132 pacientes, sete não clássicos e 14 heterozigotos foram submetidos à triagem para mutações no gene *CYP21A2* e 96 pacientes apresentaram resultados falso-positivos com *CYP21A2* do tipo selvagem. No reteste, níveis aumentados de 17-alfa-hidroxiprogesterona foram encontrados em pacientes com hiperplasia adrenal congênita clássica e mostraram correlação significativa com HAC clássica relacionada ao genótipo. As mutações mais frequentes foram IVS2-13A/C>G, seguidas de deleção gênica ou eventos de rearranjo na forma clássica. Em casos de doenças não clássicas e heterozigose, a mutação p.Val282Leu foi a mais comum.

Conclusões: Os resultados ressaltam a eficácia da triagem neonatal para a hiperplasia adrenal congênita no sistema público de saúde e indicam que a estratégia adotada foi adequada. A segunda coleta de amostras, juntamente com a genotipagem dos casos suspeitos, ajudou a diagnosticar adequadamente os casos graves e mais leves e diferenciá-los de pacientes com resultado falso-positivo.

© 2018 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Pediatria. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A hiperplasia adrenal congênita (HAC), doença autossômica recessiva, é caracterizada pelo comprometimento da síntese metabólica de cortisol e aldosterona.¹ Ela é causada por mutações no gene *CYP21A2* em aproximadamente 90% de todos os casos, leva à deficiência de 21-hidroxilase (21-OH) e causa acúmulo de precursores de androgênio.² O principal marcador da doença é a 17-alfa-hidroxiprogesterona

(17-OHP).² Existem três formas clínicas reconhecidas de HAC: forma clássica perdedora de sal (PS); virilizante simples (VS); e a forma tardia, denominada HAC não clássica (NC).^{1,3} O principal objetivo da triagem neonatal é identificar recém-nascidos em risco de serem acometidos pelas duas formas clássicas.^{4,5} No entanto, casos assintomáticos com níveis persistentemente elevados de 17-OHP na triagem neonatal são suspeitos para HAC-NC e podem ser identificados por diagnóstico molecular.^{6,7}

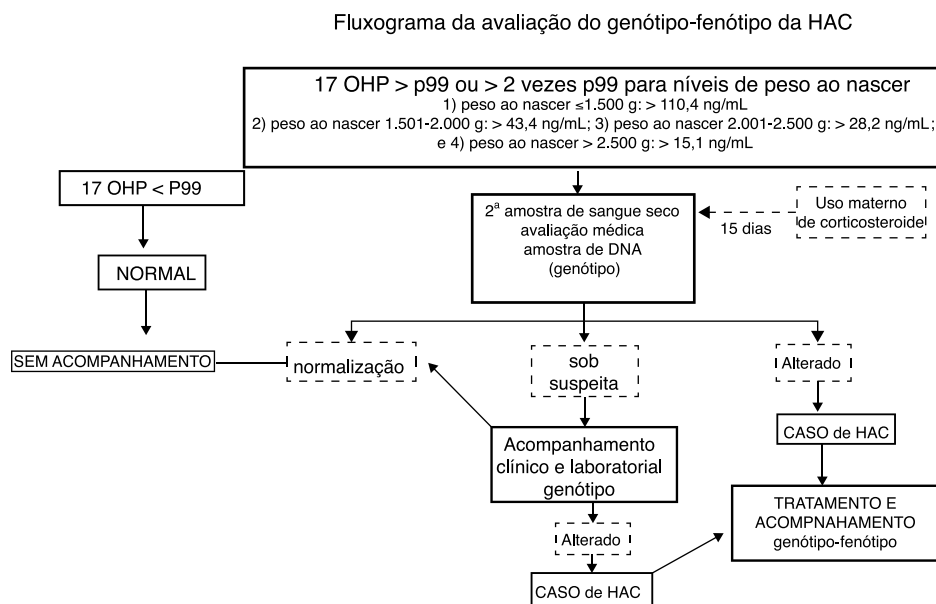


Figura 1 Fluxograma da avaliação genótipo-fenótipo da HAC. 17 OHP, 17-alfa-hidroxiprogesterona; HAC, hiperplasia adrenal congênita. Adaptado de Kopacek et al.¹⁸

A incidência global de HAC descrita na literatura é de 1:15.000 em recém-nascidos vivos.⁴ A prevalência de HAC-NC é estimada em 1:1.000 indivíduos.¹ Em 2/3 dos casos das formas clássicas, a perda de sal afeta ambos os gêneros e os sintomas começam na segunda semana de vida, reforça a importância do diagnóstico precoce.⁵ Nas meninas, a exposição excessiva ao androgênio intrauterino causa diferentes graus de virilização e ambiguidade genital, conforme definido pela Escala de Prader.⁸ Aumentos na 17-OHP foram observados em recém-nascidos sem HAC (falso-positivos) devido a situações estressantes e parto prematuro.^{9,10} Por sua vez, casos falsos negativos podem ocorrer como resultado do uso materno de corticosteroides no fim da gravidez.^{11,12} Para minimizar o número de falso-positivos, foram estabelecidos pontos de corte estratificados por categorias brasileiras e internacionais de peso ao nascer.⁹⁻¹¹

A análise molecular do gene *CYP21A2* pode melhorar a especificidade da triagem neonatal e auxiliar no manejo clínico da doença.^{7,13} As principais mutações do gene *CYP21A2* foram categorizadas em quatro grupos (Null, A, B e C), de acordo com a atividade enzimática residual da 21-OH, o que permite a determinação do fenótipo esperado.^{2,6,14,15} Tanto o tipo Null quanto o A estão associados ao HAC-PS, o grupo B ao HAC-VS e o grupo C ao HAC-NC.^{2,6,13-15}

No Brasil, Goiás, Santa Catarina e São Paulo acumulam mais de 10 anos de experiência em triagem de HAC neonatal.^{9,14,16,17} Assim, os objetivos deste estudo foram: 1) descrever os resultados 24 meses após a triagem neonatal de HAC em um programa de saúde pública no Sul do Brasil; e 2) avaliar os quadros clínicos de casos confirmados e suspeitos de HAC, além da genotipagem molecular desses casos como uma ferramenta complementar para melhorar o diagnóstico da HAC.

Métodos

Foi feito um estudo transversal com recém-nascidos incluídos nos dois primeiros anos da implantação do programa público de triagem de HAC no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foi revisado um banco de dados de bebês com suspeita de HAC, baseado em valores alterados de 17-OHP a partir de uma triagem feita de 2014 a 2016. A HAC clássica (HAC-C), PS e VS, foi diagnosticada pelo aumento dos níveis de 17-OHP detectados na triagem, confirmado por reteste e/ou avaliação clínica, seguido por estudos genotípicos. As meninas afetadas apresentaram genitália externa virilizada, enquanto os meninos não necessariamente apresentaram alterações genitais, mas o aumento do pênis pôde ser observado. Os falsos positivos foram caracterizados por níveis mais baixos de 17-OHP no reteste e pelo genótipo do tipo selvagem (WT, do inglês *wild type*), de acordo com a figura 1.¹⁸ Os dados relacionados à distribuição dos genótipos foram relatados recentemente.¹⁹

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (n° 341.289/8 de junho de 2013); todos os pais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Amostras de sangue seco foram obtidas com papel de filtro (S&S 903) do 3° ao 40° dia do pós-natal. O ensaio de imunofluorescência *GSP de fase sólida (time-resolved)* (kit Neonatal 17-OHP; Perkin-Elmer, Turku, Finlândia) foi usado para medir a 17-OHP. A figura 1 descreve a estratégia do estudo.^{9,11,18} Os recém-nascidos submetidos ao uso de corticosteroides maternos no fim da gestação, conforme registrado em papel de filtro, foram convocados para uma segunda coleta após 15 dias de vida.^{11,12,18}

A genotipagem foi feita conforme descrito anteriormente por Prado et al.¹⁹ em 132 indivíduos. O ensaio SNaPshot foi usado para todos os indivíduos. Esse ensaio analisou 12 mutações de ponto no gene *CYP21A2* (p.Gln319Ter, p.Arg357Trp, p.Leu308Phefs, p.Val237Glu, IVS2-13A/C>G, p.Ile173Asn, p.Pro31Leu, p.Pro454Ser, p.Val282Leu, p.Gly111Valfs, p.Arg409Cys e p.His63Leu).¹⁹⁻²¹ Para casos com suspeita clínica e/ou bioquímica de HAC clássica, mas nenhuma mutação identificada pela técnica anterior, um kit comercial de amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (MLPA, do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) com o kit SALSA MLPA probemix P050-C1 CAH (MRC Holland, Amsterdã, Holanda) foi usado para detectar eventos de rearranjos.

Os resultados foram expressos como média + desvio padrão (DP) ou frequências (%). As comparações entre os grupos foram analisadas por análise de variância (Anova) univariada seguida pelo teste de Tukey. A análise de covariância (Ancova) foi usada para ajustes de 17-OHP por peso ao nascer e os dados foram expressos como média + erro padrão da média (EPM). Uma correlação parcial foi estimada entre 17-OHP e eletrólitos. As análises foram feitas com o programa SPSS (PASW Estatística para Windows, Versão 18.0. Chicago, EUA). Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

De 217.965 amostras obtidas na triagem de dois anos, 15 casos de HAC-C foram diagnosticados, com uma incidência estimada de 1:14.531. Nove recém-nascidos eram do sexo feminino e seis do masculino e 80% ($n = 12$) foram clinicamente caracterizados como pacientes com HAC-PS e o restante como pacientes com a forma VS. De acordo com nossos dados publicados anteriormente,¹⁸ 70-80% da primeira amostra tinham sido coletados entre três e sete dias de vida e esse achado foi semelhante ao HAC-C [mediana 5 (2,0 a 38,0) dias]. A maioria das amostras de reteste foi coletada em torno da segunda ou terceira semana de vida [mediana 17 (14,0-21,0) dias], semelhantemente à HAC-C [mediana 19 (8,0-51,0) dias]. A **tabela 1** descreve os dados clínicos, os valores de 17-OHP e eletrólitos e a avaliação fenotípica-genotípica desses casos. Três meninas (casos 3, 5 e 11) apresentaram virilização leve (classificação de Prader I) e não foram caracterizadas clinicamente como portadoras de clitoromegalia antes da triagem da HAC. Outra menina (caso 2) foi designada como um menino e a outra (caso 10) foi registrada com um nome neutro, adequado para os dois sexos, devido à ambiguidade genital. Nas outras quatro meninas (casos 4, 12, 13 e 14), a ambiguidade genital foi identificada, mas a HAC não foi diagnosticada antes da triagem. Entre os meninos, os casos 6 e 15 apresentaram aumento do pênis e os outros quatro tinham genitália masculina normal. Dez dos 15 casos (66,6%) nasceram com peso > 2.500 g e nenhum caso pesava < 2.000 g. As mães de três casos (5, 8 e 10) usavam glicocorticoides no fim de suas gestações. Em dois casos, foi observado um aumento líquido nos níveis de 17-OHP na segunda amostra. Em um terceiro lactente (caso 8), o início da corticoterapia por perda de sal antecedeu a possibilidade de obtenção de uma segunda amostra. Quatro bebês (26,6%) tinham pais consanguíneos.

A **tabela 1** também descreve o perfil clínico, os valores de 17-OHP e a avaliação do fenótipo-genótipo dos casos de HAC-NC e heterozigotos que foram detectados durante a triagem. Apenas um paciente heterozigoto (caso 31) apresentou baixo peso ao nascer relacionado à prematuridade extrema e valor aumentado de 17-OHP na segunda amostra, associado à pioria clínica na unidade intensiva neonatal. Esse paciente foi acompanhado em um hospital terciário distante do centro de triagem. Foram relatados valores eletrolíticos normais sem qualquer outro sinal clínico de HAC por esse hospital. Uma terceira amostra foi coletada após melhoria clínica e mostrou uma diminuição considerável de 17-OHP (17 ng/mL). Nesse paciente, o genótipo foi crucial para a elucidação do diagnóstico. Outros três pacientes com HAC-NC (16, 17 e 22) apresentaram valores maiores de 17-OHP na segunda amostra e um histórico de uso de corticosteroide pela mãe. Não foram observadas hiponatremia e hipercalemia nos casos de HAC-NC e heterozigotos. Entre os casos iniciais suspeitos de HAC, um paciente com hiperpigmentação genital transitória (paciente 16) foi diagnosticado como HAC-NC e três meninas com clitoromegalia transitória foram posteriormente identificadas como casos heterozigotos. Nesses casos, a regressão espontânea da clitoromegalia foi observada durante o seguimento até os primeiros seis meses de vida. A consanguinidade dos pais foi encontrada em dois (14,3%) dos pacientes heterozigotos.

A **tabela 1** mostra a distribuição dos genótipos de acordo com os grupos de atividade enzimática (Null, A, B e C) e heterozigosidade na população de recém-nascidos. A concordância genótipo-fenótipo foi observada em 13 casos de HAC-C (86,6%). A mutação IVS2-13A/C>G foi a mais frequente (33% em homozigose e 20% em heterozigosidade composta), seguida pela p.Ile173Asn, deleção e conversão gênica, cada uma observada em 20% dos casos de HAC-C. Sete pacientes apresentaram mutações não clássicas (grupo C) e os outros 14 pacientes heterozigotos tiveram o alelo WT detectado durante a triagem neonatal. Na amostra total, a mutação p.Val282Leu foi a mais frequente nos pacientes com HAC-NC (57% heterozigotos e 28,5% homozigotos) e também em seis pacientes heterozigotos (43%) (**tabela 1**). Um novo alelo IVS2-13A/C>T foi descrito por Prado et al. em uma menina heterozigota nascida a termo com peso ao nascer de 2.905 g (amostra 1: 17 OHP 18,2 ng/mL e amostra 2: 35,0 ng/mL) e em um menino prematuro tardio com peso de nascimento de 2.540 g (amostra 1: 17-OHP 25,3 ng/mL e amostra 2: 15,9 ng/mL) com triagem positiva.¹⁹ Surpreendentemente, a clitoromegalia identificada na menina durante o primeiro exame foi resolvida espontaneamente durante o período de seguimento. Ambos apresentaram perfil eletrolítico normal e não tinham quaisquer outros sintomas associados à HAC durante o seguimento de seis meses.

Os níveis de 17-OHP, ajustados para o peso ao nascer, foram analisados de acordo com os grupos (1 = HAC-C; 2 = HAC-NC; 3 = heterozigoto; 4 = WT) nas amostras 1 e 2 (**fig. 2A** e **B**, respectivamente). Foram observados níveis significativamente mais altos de 17-OHP na HAC-C em comparação com outros grupos nas amostras 1 e 2. A **figura 3** mostra os níveis de 17-OHP, ajustados para o peso ao nascer, nas amostras 1 e 2, classificados de acordo com os grupos de mutação. Na amostra 1, indivíduos com grupos de mutação Null e A apresentaram níveis significativamente mais altos de 17-OHP e na amostra 2, os grupos de mutação Null, A e B

Tabela 1 Aspectos clínicos e genótipos em pacientes com HAC clássica, não clássica e heterozigótica

	Paciente nº	Sexo	Peso (g)	Uso de corticoide materno	Consanguinidade	17 OHP (ng/mL) Amostra 1	17 OHP (ng/mL) Amostra 2	[NA ⁺] ^e (nmol/L)	[K ⁺] ^e (nmol/L)	Virilização/ Escala de Prader	Fenótipo HAC	Genótipo	Grupos de mutação	Correlação fenótipo/genótipo
HAC clássica	1	M	3.640	não	sim	105,0	283,0	133	5,91	Normal	PS	IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	A/A	sim
	2	F	3.325	não	sim	432,0	759,0	108	5,4	Prader IV	PS	Del CYP21A2 / LGC	null/null	sim
	3	F	2.490	não	não	44,9	94,9	132	5,58	Prader I	VS	IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	A/A	não
	4	F	2.040	não	não	512,0	521,0	126	5,34	Prader III	PS	Del 30Kb / IVS-2-13A/C>G	null/A	sim
	5	F	3.200	sim	não	61,8	209,0	132	5,0	Prader I	VS	Del CYP21A2 / p.Ile173Asn	null/B	sim
	6	M	3.450	não	não	733,0	-	120	5,7	Aumento do pênis	PS	Del CYP21A2 / Cluster E6	null/null	sim
	7	M	2.980	não	não	461,0	489,0	109	6,54	Normal	PS	Del CYP21A2 / p.Arg357Trp	null/null	sim
	8	M	3.295	sim	sim	382,0	-	126	6,6	Normal	PS	IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	A/A	sim
	9	M	2.395	não	não	469,0	435,0	118	8,9	Normal	PS	IVS2-13A/C>G / LGC	null/A	sim
	10	F	2.270	sim	não	37,0	354,0	129	5,9	Prader IV	PS	IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	A/A	sim
	11	F	2.890	não	não	34,2	133,0	130	5,3	Prader I	PS	LGC / p.Ile172Asn	null/B	não
	12	F	3.580	não	não	459,0	-	131	6,0	Prader IV	PS	IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	A/A	sim
	13	F	3.730	não	sim	515,0	-	-	-	Prader IV	PS	p.Gln319Ter / p.Gln319Ter	null/null	sim
	14	F	3.500	não	não	65,2	313,0	125	7,4	Prader III	PS	p.Leu308Phefs / IVS2-13A/C>G	null/A	sim
	15	M	2.340	não	não	32,5	58,0	131	5,85	Aumento do pênis	VS	p.Ile173Asn / p.Ile173Asn	B/B	sim
	média ± DP/% positivo		3.0083 (± 0,588)	20%	27%	289,57 ^d (± 240,13)	331,72 ^d (± 210,37)	125 ± 8,30 ^d	6,10 ± 1,01 ^d					86,6%
HAC não clássica	16	M	3.465	Sim	Não	2,8	46,30	135	5,11	Normal ^a	NC	p.Val282Leu / p.Val281Leu	C	Sim
	17	M	3.340	Sim	Não	4,16	15,1	136	5,25	Normal	NC	p.Val282Leu / p.Val282Leu	C	Sim
	18	M	2.508	Não	Não	31,2	5,00	135	4,84	Normal	NC	p.Gln319Ter / p.Val282Leu	C	Sim
	19	F	2.660	Não	Não	38,2	47,2	135	5,3	Normal	NC	p.Pro454Ser / p.Pro454Ser	C	Sim
	20	F	2.988	Não	Não	15,2	18,3	131	5,82	Normal	NC	p.Gln319Ter + p.Arg357Trp + p.Leu308Phefs / p.Val282Leu	C	Sim

Tabela 1 (Continuação)

Paciente n°	Sexo	Peso (g)	Uso de corticoide materno	Consanguinidade	17 OHP (ng/mL) Amostra 1	17 OHP (ng/mL) Amostra 2	[NA ⁺] ^e (nmol/L)	[K ⁺] ^e (nmol/L)	Virilização/Escala de Prader	Fenótipo HAC	Genótipo	Grupos de mutação	Correlação fenótipo/genótipo
21	M	2.830	Não	Não	25,8	15,1	129 ^b	4,67	Normal	NC	IVS2-13A/C>G / p.Val282Leu	C	Sim
22	F	2.630	Sim	Não	15,1	22,1	135	5,4 ^c	Normal	NC	p.Arg357Trp / p.Val282Leu	C	Sim
média ± DP% positivo		2.9173 (± 0,366)	43%	0%	18,92 (± 13,39)	24,16 (± 16,28)	134,5 ± 1,76	5,16 ± 0,40					100%
Heterozigoto													
23	F	3.680	Sim	Não	14,5	15,4	133	5,6	Normal	Nenhuma	p.Gln319Ter / WT	null/WT	Sim
24	M	2.750	Não	Não	18,3	16,9	135	5,96	Normal	Nenhuma	p.Arg357Trp / WT	null/WT	Sim
25	F	2.605	Sim	Não	24,5	16,9	134	-	Normal	Nenhuma	p.Gln319Ter / WT	null/WT	Sim
26	M	2.345	Sim	Não	6,1	17,7	135	5,3	Normal	Nenhuma	p.Val282Leu / WT	C/WT	Sim
27	M	2.570	Não	Sim	31,0	11,5	133	6,34 ^c	Normal	Nenhuma	p.Val282Leu / WT	C/WT	Sim
28	M	2.535	Sim	Não	36,8	9,0	134	5,11	Normal	Nenhuma	p.Gln319Ter / WT	null/WT	Sim
29	M	2.600	Não	Não	50,9	10,9	137	5,4	Normal	Nenhuma	p.Arg357Trp / WT	null/WT	Sim
30	M	2.550	Sim	Sim	25,8	16,2	131	5,18	Normal	Nenhuma	p.Val282Leu / WT	C/WT	Sim
31	M	1.215	Não	Não	30,1	127,0 ^h	-	-	Normal	Nenhuma	p.Val282Leu / WT	C/WT	Sim
32	F	2.504 ^g	Não	Não	35,3	10,4	134	4,95	Clitoromegalia transitória	Suspeita de HAC ^f	p.Val282Leu / WT	C/WT	Não
33	F	3.150	Não	Não	15,4	16,10	135	4,3	Normal	Nenhuma	p.Gln319Ter / WT	null/WT	Sim
34	F	2.560 ^g	Sim	Não	22,4	16,7	137	5,15	Clitoromegalia transitória ^a	Suspeita de HAC ^f	p.Val282Leu / WT	C/WT	Não
35	M	2.750	Não	Não	25,3	15,9	136	5,29	Normal	Nenhuma	IVS2-13A/C>T / WT	nd/WT	Sim
36	F	2.905 ^g	Não	Não	18,20	35,0	139	4,8	Clitoromegalia transitória	Suspeita de HAC ^f	IVS2-13A/C>T / WT	nd/WT	Não
média ± DP/% positivo		2.623 (± 0,535)	43%	14%	25,33 (± 11,21)	23,97 (± 30,28)	134,85 ± 2,075	18 ± 0,43					79%

F, sexo feminino; HAC, hiperplasia adrenal congênita; HT, heterozigoto; LGC, *Large Gene Conversion*; M, sexo masculino; NC, não clássica; nd, não definido.

^a Hiperpigmentação leve descrita no primeiro exame clínico.

^b Na normalizado na reanálise (erro de laboratório admitido).

^c Hemólise descrita no resultado laboratorial.

^d $p < 0,05$ Grupo HAC clássica *versus* outros.

^e Variações normais para Na 135-145 nmol/L e para K 3,5-5,5 nmol/L.

^f HAC clássica suspeita na primeira avaliação clínica do endocrinologista pediátrico, não confirmada no seguimento.

^g (Caso 10: Prematuro, 35 semanas; Caso 12: A termo, 38 semanas; Caso 14: A termo, 39 semanas).

^h Amostra 3: 17,10 ng/mL.

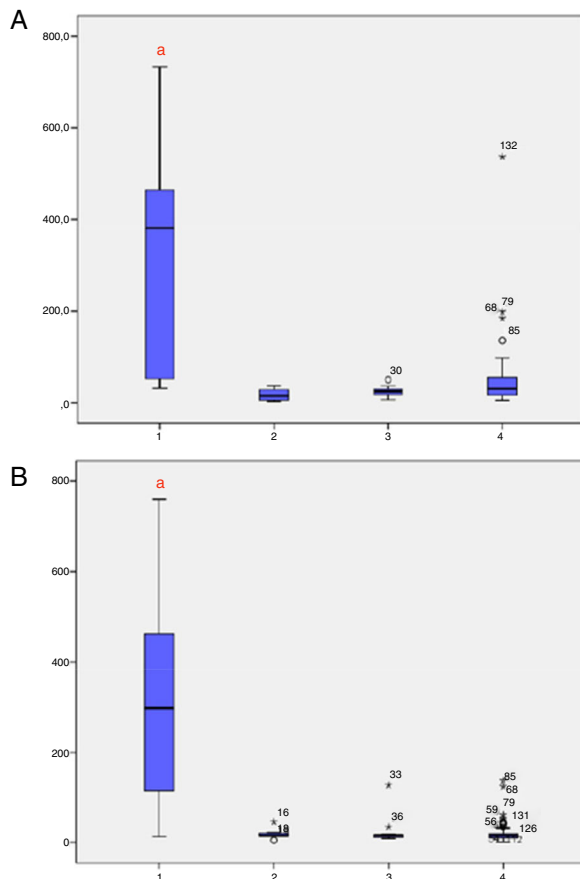


Figura 2 Níveis de 17-OHP nos quatro grupos (HAC clássica, HAC-NC, heterozigoto e tipo selvagem). Quatro grupos (1 = HAC clássica; 2 = HAC NC; 3 = heterozigoto; 4 = Tipo selvagem). A, Níveis de 17-OHP na amostra 1; B, Níveis de 17-OHP na amostra 2. HAC, hiperplasia adrenal congênita; NC, não clássica. ^a $p < 0,05$ versus todos os outros grupos.

mantiveram níveis mais altos de 17-OHP, os quais foram estatisticamente diferentes do grupo C (HAC-NC), heterozigotos e pacientes WT.

A **tabela 1** também mostra os valores eletrolíticos nos diferentes grupos. Os casos de HAC-C apresentaram níveis mais elevados de Na^+ e K^+ . Foi encontrada uma forte correlação inversa entre o 17-OHP ajustado para o peso ao nascer e o Na^+ ($r = -0,795$ para Amostra 1 de 17-OHP e $r = -0,740$, para Amostra 2, $p < 0,05$) e uma correlação positiva com K^+ ($r = 0,494$ para Amostra 1 de 17-OHP e $r = 0,531$ para Amostra 2, $p < 0,05$).

Discussão

No presente estudo, o programa de triagem neonatal de dois anos da HAC que usou níveis significativamente mais altos do marcador, a 17-OHP, permitiu de maneira adequada o diagnóstico de 15 recém-nascidos com HAC clássica. Além disso, o reteste foi bem discriminado entre os casos e a gravidade da doença apresentou concordância com a investigação do genótipo correspondente.

O programa de triagem foi altamente eficaz na detecção de alguns casos que não seriam clinicamente reconhecidos

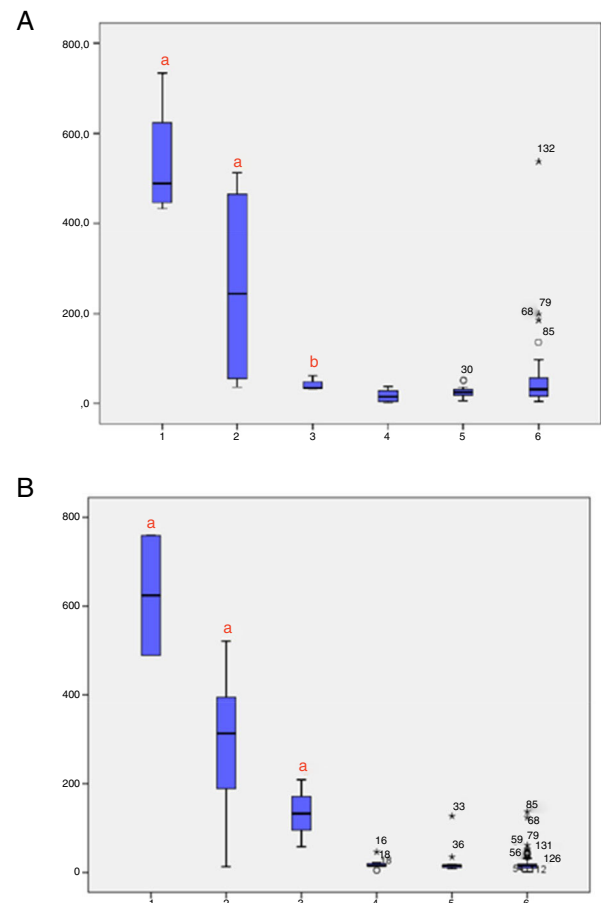


Figura 3 Níveis de 17-OHP de acordo com o genótipo (grupo de gravidade de mutação, heterozigose e tipo selvagem); A, Níveis de 17-OHP na amostra 1; B, Níveis de 17-OHP na amostra 2. Genótipo (1 = Grupo Null; 2 = Grupo A; 3 = Grupo B; 4 = Grupo C; 5 = Heterozigoto; 6 = Tipo Selvagem). ^a $p < 0,05$ versus todos os outros grupos. ^b $p < 0,05$ versus grupo 1 e 2. HAC, hiperplasia adrenal congênita; 17-OHP, 17-alfa-hidroxiprogesterona; PS, perdedora de sal; VS, virilizante simples; HAC-C, hiperplasia adrenal congênita clássica; NC, não clássica, de início tardio; WT, tipo selvagem; SPSS, *Statistical Package for the Social Sciences*.

antes da triagem. Nesse sentido, atipias genitais leves (casos 3, 4 e 11) e aumento do tamanho do pênis em meninos (casos 6 e 15) não foram detectados antes da avaliação especializada. Mesmo naqueles com genitália ambígua, a HAC não foi diagnosticada antes da triagem, a designação sexual incorreta foi feita em dois casos (2 e 10). De fato, observamos que mais de 50% das meninas tiveram uma avaliação clínica incorreta das características de virilização, o que foi identificado de maneira similar em estudos anteriores.^{9,15,22} Isso reforça a importância da triagem neonatal universal para hiperplasia no Brasil.

Em relação à grande diferença observada nos valores de corte de 17-OHP usados para as categorias de peso ao nascer,^{9,11} é importante observar que os lactentes das categorias de menor peso são comumente internados em unidades de terapia intensiva e continuamente monitorados, inclusive para distúrbios eletrolíticos. De fato, como observado anteriormente durante o primeiro ano de

triagem, a maioria dos falso-positivos era de recém-nascidos com peso < 2.000 g.¹⁸ Uma segunda amostra que mostrou níveis mais baixos de 17-OHP em casos assintomáticos é geralmente suficiente para elucidar os casos falso-positivos, especialmente em bebês prematuros e recém-nascidos de baixo peso. Além disso, como relatado anteriormente, as taxas de consanguinidade são maiores entre os casos de HAC.^{18,23} Dessa forma, essa informação adicional pode ser útil para distinguir os casos reais dos casos falso-positivos. Da mesma forma, informações sobre o uso de corticoide pela mãe no fim da gestação são relevantes. Nesse caso, a coleta de uma segunda amostra após 15 dias de vida do recém-nascido ajuda a diagnosticar casos como o do paciente 11, que apresentou virilização leve não reconhecida anteriormente e posterior desenvolvimento da HAC-PS.²²

Altos níveis de 17-OHP podem estar presentes em recém-nascidos prematuros e criticamente doentes, o que reforça a triagem estratificada pelo peso ao nascer.⁹⁻¹¹ Além disso, o genótipo foi recomendado para melhorar o diagnóstico da precisão da triagem neonatal. Ele ajuda a diferenciar os casos reais de falso-positivos, esclarece casos limítrofes e, eventualmente, permite que portadores de HAC-NC sejam diagnosticados.^{7,13,15} Nos casos confirmados, valores elevados de 17-OHP corresponderam à gravidade de cada grupo genotípico.^{14,15,22} Curiosamente, quando os níveis de 17-OHP foram estratificados de acordo com a gravidade do grupo de mutações na segunda amostra, foi observada uma melhor diferenciação das formas VS (mutações do grupo B) da HAC-NC (mutações do grupo C), heterozigotos e WT (figs. 2 e 3). Esses três últimos grupos apresentam níveis de 17-OHP significativamente menores, o que justifica a estratégia de retestar esses pacientes e, quando ainda houver dúvidas, fazer a análise do genótipo.²²

A eficácia do programa de triagem também pode ser demonstrada quando formas graves, como portadores de mutações do grupo Null, são identificadas.¹⁵ Deleção e grandes conversões gênicas que caracterizaram o grupo Null foram observadas em 20% da nossa amostra, o que está de acordo com um recente e grande estudo de correlação genótipo-fenótipo.²⁴ O grupo de mutações Null em homozigose foi observado em 26,67% de nossa amostra (4/15 pacientes) e nos grupos Null e A em heterozigose composta, o que caracterizou a HAC-PS, em outros três pacientes. No paciente 11, não houve correlações fenótipo-genótipo claras como resultado da manifestação de um fenótipo de HAC-PS leve. Quando as mutações dos grupos Null e B estão em heterozigose composta, inclusive a p.Ile173Asn em um alelo, a HAC-VS é esperada na maioria dos casos.^{6,15} Essa observação foi relatada por outros grupos,^{24,25} inclusive uma associação muito rara da mutação p.Ile173Asn com uma HAC-NC.²⁴ A HAC-PS associada à p.Ile173Asn é mais comum quando uma segunda mutação mais grave está associada em heterozigose.^{25,26}

No Brasil, um estudo de Bachega et al. determinou a frequência de mutações de ponto em 130 pacientes com HAC-C e HAC-NC e estabeleceu uma correlação genótipo-fenótipo.²⁷ As mutações mais frequentes foram a IVS2-13A/C>G, em 55% dos alelos dos pacientes com a forma PS, a p.Ile173Asn, em 42% das HAC-VS, e a p.Val282Leu, em 70% dos indivíduos com HAC-NC. A frequência da mutação IVS2-13A/C>G em nossa amostra não foi, portanto, surpreendente para a população brasileira (53% em homo e/ou

heterozigose na HAC-C). Em uma amostra brasileira de São Paulo¹⁴ e em um estudo de coorte maior na Argentina, a IVS2-13A/C>G correspondeu a 21% na frequência alélica e a 20% das mutações em homozigose,²⁸ respectivamente. O Brasil e a Argentina (AR) apresentam taxas muito semelhantes dessa mutação.^{14,28} O Estado do Rio Grande do Sul está próximo da AR e a população compartilha origens étnicas comuns. Esse grupo também descreve a associação dos alelos IVS2-13A/C>G com as formas VS,⁸ o que pode explicar o fenótipo-genótipo não concordante no caso 32.

A nova variante IVS2-13A/C>T foi identificada em dois pacientes. O alelo T foi observado nos casos em heterozigose com o alelo C benigno, como descrito anteriormente.¹⁹ Como a paciente do sexo feminino apresentou clitoromegalia ao nascimento, mesmo em casos heterozigotos, esse achado não pode ser negligenciado e requer estudos genéticos adicionais. A descrição dos três casos com clitoromegalia transitória em nossa amostra é digna de estudo adicional. Tem sido relatado que alguns pacientes heterozigotos apresentaram níveis mais elevados de andrógenos, especialmente os portadores da mutação p.Val282Leu com adrenaquia precoce.^{1,29} Espera-se que os pacientes com HAC-NC e pacientes heterozigotos sejam assintomáticos ao nascimento, mas nossa hipótese é que possíveis elevações androgênicas transitórias podem ocorrer. Estudos futuros com vistas a esclarecer esse fenômeno podem usar a genotipagem expandida pelo sequenciamento completo do gene *CYP21A2* para excluir outras mutações não detectadas pelos ensaios SNaPshot e MLPA. Em nossa amostra, um melhor entendimento dessa nova variante pode fornecer informações mais específicas.

Um dos pontos fortes deste estudo foi que os diagnósticos e exames de acompanhamento foram feitos pelo mesmo endocrinologista pediátrico. Portanto, a avaliação clínica adequada dos pacientes feita neste estudo é apropriada para a caracterização clínica e molecular dessa amostra na triagem neonatal da HAC. Outro ponto forte foi o fato de os dados terem sido coletados a partir de um programa de triagem populacional, o que favoreceu a avaliação de um grande número de indivíduos. Nesse contexto, nosso estudo foi o primeiro programa de triagem neonatal/genotipagem com o uso da metodologia SNaPshot.¹⁹ Essa estratégia permite detectar simultaneamente as 12 mutações mais comumente associadas à HAC de forma rápida e ágil e agrega qualidade ao programa de triagem neonatal. Esse grupo de mutações de ponto representa 89% das mutações detectadas em nossa coorte do sul do Brasil.¹⁹

Em conclusão, os resultados deste estudo ressaltam a eficácia do programa de triagem na detecção de casos de HAC e na exclusão de casos suspeitos com base em pontos de corte dos níveis de 17-OHP ligados à estratificação pelo peso ao nascer. Além disso, a coleta da segunda amostra, seguida pela genotipagem das amostras suspeitas, ajudou a diagnosticar adequadamente casos graves de HAC-PS/VS e casos mais leves de VS, além de diferenciar entre casos de HAC-C e pacientes falsos positivos. Os presentes resultados também indicaram que a genotipagem é uma ferramenta diagnóstica valiosa e complementar para a triagem neonatal, a qual fornece informações sobre a gravidade da doença, permite o aconselhamento genético em casos graves e evita o tratamento excessivo da HAC-NC de início tardio e dos pacientes falsos positivos.

Financiamento

Este trabalho foi financiado por bolsas de estudo do Instituto Nacional Brasileiro de Hormônios e Saúde da Mulher, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq INCT 573747/2008-3], do Sistema Nacional Brasileiro de Saúde Pública (PPSUS) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (Fapergs), Porto Alegre, Brasil.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21:245–91.
- Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:181–92.
- Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011;32:81–151. Erratum in: *Endocr Rev.* 2011;32:579.
- Pang S, Clark A. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of disorder. *Screening.* 1993;2:105–39.
- Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:4133–60.
- Bachega T, Billerbeck AE, Parente EB, Lemos-Marini S, Baptista MT, Mello MP, et al. Estudo multicêntrico de pacientes brasileiros com deficiência da 21-hidroxilase: correlação do genótipo com o fenótipo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48:697–704.
- Silveira EL, Elnecape RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, et al. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet.* 2009;76:503–10.
- Prader A. Der Genitalbefund beim Pseudohermaphroditismus Femininus des kongenitalen Adrenogenitalen Syndromes. *Helv Paediatr Acta.* 1954;3:231–48.
- Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira E, et al. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55:632–7.
- Olgemöller B, Roscher AA, Liebl B, Fingerhut R. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5790–4.
- Araújo JP, Goldbeck AS. Triagem neonatal: hiperplasia adrenal congênita. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
- Gatelais F, Berthelot J, Beringue F, Descamps P, Bonneau D, Limal JM, et al. Effect of single and multiple courses of prenatal corticosteroids on 17-hydroxyprogesterone levels: implication for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Res.* 2004;56:701–5.
- Balsamo A, Baldazzi L, Menabò S, Cicognani A. Impact of molecular genetics on congenital adrenal hyperplasia management. *Sex Dev.* 2010;4:233–48.
- de Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marcondes JA, Billierbeck AE, et al. Molecular CYP21A2 diagnosis in 480 Brazilian 433 patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *Eur J Endocrinol.* 2016;175:107–16.
- Falhammar H, Wedell A, Nordenström A. Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine.* 2015;50:306–14.
- Silveira EL, dos Santos EP, Bachega TA, van der Linden Nader I, Gross JL, Elnecape RH. The actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as inferred: an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goiás. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008;21:455–60.
- Nascimento ML, Cristiano AN, Campos T, Ohira M, Cechinel E, Simoni G, et al. Ten-year evaluation of a neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58:765–71.
- Kopacek C, Castro SM, Prado MJ, Silva CM, Beltrão LA, Spritzer PM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Southern Brazil: a population-based study with 108,409 infants. *BMC Pediatr.* 2017;17:22.
- Prado MJ, de Castro SM, Kopacek C, de Mello MP, Rispoli T, Grandi T, et al. Development of CYP21A2 genotyping assay with potential diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Mol Diagn Ther.* 2017;21:663–75.
- Krone N, Braun A, Weinert S, Peter M, Roscher AA, Partsch CJ, et al. Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm 356 congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem.* 2002;48:818–25.
- Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Guerra G, et al. Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2416–20.
- Nordenstrom A, Thilen L, Hagenfeldt L, Larsson A, Wedell A. Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1505–9.
- Vakili R, Baradaran-Heravi A, Barid-Fatehi B, Gholamin M, Ghameni N, Abbaszadegan MR. Molecular analysis of the CYP21 gene and prenatal diagnosis in families with 21-hydroxylase deficiency in northeastern Iran. *Horm Res.* 2005;63:119–24.
- New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumić M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:2611–6.
- Díez López I, Rodríguez Estévez A, González Molina E, Martínez Ayucar M, Rodríguez Pérez B, Ezquieta Zubizaray B. Síndrome suprarrenal congénito virilizante con mutación de novo I172N: estudio de un nuevo caso. *An Pediatr (Barc).* 2010;72:72–8.
- Frish H, Battelino T, Shober E, Baumgartner-Parzer S, Nowotny P, Vierhapper H. Salt wasting in simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;14:1649–55.
- Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients 446 with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:4416–9.
- Marino R, Ramirez P, Galeano J, Perez Garrido N, Rocco C, Ciaccio M, et al. Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;75:427–35.
- Neocleous V, Shamma C, Phedonos AP, Karaoli E, Kyriakou A, Toumba M, et al. Genetic defects in the CYP21A2 gene in heterozygous girls with premature adrenarche and adolescent females with hyperandrogenemia. *Georgian Med News.* 2012:40–7.